

# 尾静脉注射 HL60、HL60/ADR 细胞建立 SCID beige 小鼠白血病动物模型的研究

张 坤<sup>1</sup>, 徐昊淼<sup>1</sup>, 程 涓<sup>1</sup>, 赵 勇<sup>2</sup>, 许亚梅<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国科学院动物所, 北京 100101)

**【摘要】** **目的** 应用急性早幼粒细胞 HL60 及耐阿霉素 (adriamycin, ADR) 细胞 HL60/ADR, 构建 SCID beige 小鼠白血病模型。**方法** 将 15 只 4 ~ 5 周龄的雌性 SCID beige 小鼠, 随机分为对照组 3 只、四组模型 12 只 (每组 3 只)。经 2GyX 射线预处理, 模型组分别经尾静脉接种对数生长期 HL60 细胞悬液  $1 \times 10^7$  个/只 (M1 组)、 $5 \times 10^6$  个/只 (M2 组), HL60/ADR 细胞悬液  $1 \times 10^7$  个/只 (M3 组)、 $5 \times 10^6$  个/只 (M4 组), 对照组鼠尾静脉注射等剂量生理盐水。观察一般情况, 于照射前、造模第 10、18、28 天检测血常规、外周血白细胞分类、外周血 CD33 阳性细胞比例, 第 32 天或濒死时处死取材, 组织切片病理检查。**结果** 各模型组于接种细胞第 7 天开始, 出现竖毛、萎靡少动、脊背弓起、步态不稳、偏侧或转圈, M1、M3 两组较 M2、M4 两组体重下降更明显 ( $P < 0.05$ ), 显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。至观察周期 32 d, M1、M3 两组生存率分别为 33%、67%, M2、M4 两组全部生存。各组小鼠经 X 线照射 7 d 内白细胞数迅速降低, 随时间推移逐渐上升, 第 28 天各模型组白细胞计数均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 且各模型组白血病细胞比例亦明显升高, 以接种 HL60/ADR 的 M3 组最为显著 ( $P < 0.05$ ); 接种第 28 天时各模型组 CD33 阳性细胞比例显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 然各模型组间差异无显著性。第 32 天或濒死前取材, 病理组织切片, 造模各组脾均可见弥漫性白血病细胞浸润, 肝偶见白血病细胞浸润灶。**结论** SCID beige 小鼠经 2GyX 射线预处理后, 每只尾静脉注射 HL60、HL60/ADR 细胞  $1 \times 10^7$  个或  $5 \times 10^6$  个均可构建急性髓系白血病动物模型, 符合急性髓系白血病的生物学特点, 高浓度成瘤更快, 中位生存期约 29 d。

**【关键词】** 小鼠模型; 白血病; HL60 细胞; HL60/ADR 细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0043-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.07.008

## Establishment of a human acute leukemia pathological model in SCID beige mice using HL60 and HL60/ADR cell lines

ZHANG Kun<sup>1</sup>, XU Haomiao<sup>1</sup>, CHENG Juan<sup>1</sup>, ZHAO Yong<sup>2</sup>, XU Yamei<sup>1\*</sup>

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China.

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

**【Abstract】** **Objective** To establish a stable, effective, and reproducible acute promyelocytic leukemia model in severe combined immunodeficient (SCID) beige mice using acute myelocyte HL60 and adriamycin (ADR)-resistant HL60/ADR cell lines. **Methods** Female SCID beige mice (4 - 5 weeks old) were divided randomly into one control group and four model groups with three mice in each group. After X-ray irradiation, SCID mice received  $1 \times 10^7$  (M1

[基金项目] 北京市自然科学基金 (编号: 7152092)。

[作者简介] 张坤 (1991—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 中西医结合防治血液病。E-mail: qiu\_yiqiu@163.com

[通信作者] 许亚梅 (1975—), 女, 博士, 研究方向: 中西医结合防治血液病。E-mail: xuyamei@sina.com

group) or  $5 \times 10^6$  (M2 group) HL60 cells, or  $1 \times 10^7$  (M3 group) or  $5 \times 10^6$  (M4 group) HL60/ADR cells via tail vein injection. The white blood cell (WBC) count and positive rate of promyelocytes in peripheral blood were dynamically monitored by detecting cells expressing CD33 using flow cytometry. Morphological examination and histopathological assays were employed to confirm promyelocyte infiltration into organs (liver, spleen, and kidneys). **Results** The four model groups displayed abnormal behaviors of tremors, retardation, and piloerection. The two high dose model groups experienced significant weight loss compared with the two low dose model groups ( $P < 0.05$ ). Moreover, the four model groups had significantly lower body weights than the control group ( $P < 0.01$ ). At day 32, survival rates of M1 and M3 groups were 33% and 67%, respectively. All mice in M2 and M4 groups survived. The WBC count in peripheral blood declined after X-ray irradiation. At day 28 after inoculation, the peripheral blood WBC counts of the four model groups were significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). At day 28, the leukemic cell percentage of the M3 group was the highest compared with the other three model groups ( $P < 0.05$ ). The rates of CD33-positive cells in flow cytometric analysis of the four model groups were higher than that in the control group at day 28, but there were no significant differences between the four model groups. Morphological examination and HE staining of tissue biopsies demonstrated a large number of promyelocytes in the spleen and liver. **Conclusions** The human acute leukemia SCID beige mouse model was successfully established by tail vein injection of  $5 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  HL60 or HL60/ADR cells. This model mimics the biological characteristics of acute myeloid leukemia. The survival period of the high dose SCID beige mouse model was short with a median survival time of about 29 days.

**【Key words】** mouse model; leukemia; HL60 cells; HL60/ADR cells

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是髓系造血干祖细胞恶性克隆的疾病,表现为原始细胞的分化障碍和恶性增殖。白血病细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR)是化疗失败的主要原因,耐药蛋白可在多种细胞内高表达<sup>[1-2]</sup>,MDR细胞具有很强的抗凋亡特性,因此寻求能抑制耐药蛋白表达及诱导MDR细胞凋亡的新药是目前研究的热点之一<sup>[3-4]</sup>。动物模型是新药探索、筛选评价的重要基础。本研究应用急性早幼粒细胞HL60及耐阿霉素(adriamycin, ADR)细胞HL60/ADR,构建稳定、有效、重复性好的急性髓系白血病模型,模拟临床白血病累及骨髓和全身播散的特点,为研究人类白血病耐药机制及药物治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF级雌性SCID beige小鼠15只,体重(15.98 ± 0.57)g,4~5周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2017-0022]。饲养于中国科学院动物研究所屏障环境动物房[SYXK(京)2013-0015],含复合维生素B的标准颗粒饲料、饮水、垫料及一切与鼠接触的物品经灭菌处理,动物实验室温度保持在25℃左右,相对湿度保持在40%~70%,每日光照12h,适应性饲养一周。实验方案通过北京中医药大学东直门医院实验动物管理和使用

委员会(IACUC)审批(2015-68)。

#### 1.1.2 实验细胞株

HL60、HL60/ADR细胞株自中国医学科学院血液病研究所购入,接种于10cm细胞培养皿,以含10%血清的培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养箱中培养,每2~3d传代,HL60/ADR在含阿霉素0.5μg/mL的10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中维持耐药,实验前一周撤药。

### 1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640培养基(北京利维宁生物科技有限公司),DMEM高糖培养基(美国HyClone公司),胎牛血清(天津康源生物技术有限公司),青霉素和链霉素各100U/mL(Sigma),anti-humanCD13-PE、anti-humanCD33-FITC(ThermoFisher)。CO<sub>2</sub>培养箱(德国Heraeus公司),台式冷冻离心机(美国ThermoScientific,型号SorvallLegendRT),X-ray生物学辐照仪(RS-2000PROBiologicalSystem)、流式细胞仪(美国BeckmanCoulter公司,型号EpicsXL)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组及HL60、HL60/ADR细胞移植

将15只SCID beige小鼠随机分为对照组3只、四组模型12只(每组3只)。移植前24h内均照射2GyX射线,模型组分别经尾静脉接种对数生长期HL60细胞悬液 $1 \times 10^7$ 个/只(M1组)、 $5 \times 10^6$ 个/只(M2组),HL60/ADR细胞悬液 $1 \times 10^7$ 个/只(M3组)、 $5 \times 10^6$ 个/只(M4组),对照组鼠尾静脉注射

等剂量生理盐水。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

### 1.3.2 SCID beige 小鼠发病情况观察

观察 SCID beige 小鼠发病情况及生存期,测量实验动物体重变化情况。

### 1.3.3 SCID beige 小鼠外周血常规及血涂片检测

照射前和接种后第 10、18、28 天分别经尾静脉取 80  $\mu$ L 外周血,置于 EDTA 抗凝管中,送至北京中医药大学东直门医院检验科测定外周血中白细胞 (white blood cell, WBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 含量和血小板 (platelet, PLT)。同时取外周血吉姆萨-瑞氏染色后,油镜下观察细胞形态,每片计数 100 个细胞,计算白血病细胞的比例。

### 1.3.4 检测 CD13、CD33 表达情况

CD13、CD33 是髓系细胞表面分化抗原,特别是在分化早期阶段<sup>[5]</sup>,故应用流式细胞技术检测外周血中 CD13、CD33 表达,并采用人源 anti-human CD13-PE、anti-human CD33-FITC 进行标记检测 HL60 细胞<sup>[6]</sup>。照射前和接种后第 10、18、28 天分别经尾静脉取 50  $\mu$ L 外周血,加入 2  $\mu$ L 肝素抗凝,加入 1.8 mL 二蒸水低渗裂解红细胞及血小板 20 s 后,加入 0.2 mL MPBS 终止反应,离心后弃去上清,每个样本加 5  $\mu$ L CD13-PE、CD33-FITC,混匀,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后,上流式细胞仪测定 CD13、CD33 细胞比例。

### 1.3.5 SCID beige 小鼠骨髓细胞学检查

于濒死前断髓,剥离股骨、胫骨,放入平皿,剪去骨髓两端,并用 1 mL 注射器吸取 PBS 缓冲液冲洗股骨骨干,冲出骨髓细胞,冲 3 ~ 4 次,用注射器吸取骨髓液,慢慢将骨髓液经滤网注入离心管中,

去除残渣,1700 r/min 离心 5 min,倒上清,加入 1 mL 红细胞裂解液 (25 s),再加 PBS 至 10 mL,1700 r/min 离心 5 min,倒掉上清,最后得到的白色沉淀为骨髓细胞,加入 50  $\mu$ L 胎牛血清反复吹打重悬,进行骨髓细胞涂片细胞学检查。

### 1.3.6 小鼠组织病理检查

第 32 天或濒死前处死小鼠,取其脾、肝、肾等脏器及肉眼可见瘤块,脾称重,并将取出的脏器及瘤块于 4% 甲醛固定 24 h,然后进行常规石蜡包埋切片,切片厚度为 2  $\mu$ m,行 HE 染色,并在显微镜下观察白血病细胞浸润。

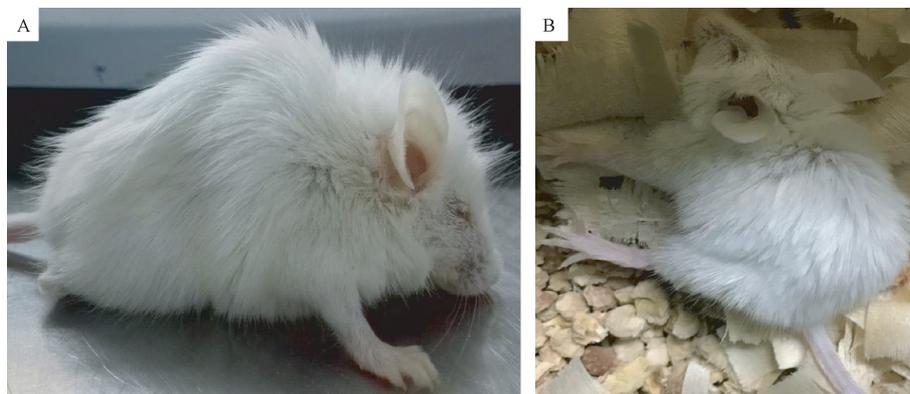
## 1.4 统计学方法

所有资料用 Excel 记录,小鼠生存期,体重变化,外周血白细胞计数,血红蛋白含量,血小板计数,CD13、CD33 阳性细胞比例等数据均以平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,两组间比较,符合正态分布用独立样本 *t* 检验,不符合用非参数检验,多组间比较,符合正态分布且方差齐应用单向方差分析,不符合采用非参数检验, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 SCID beige 小鼠的生存状态观察

模型 M1、M3 组接种细胞 7 d 后,开始出现竖毛、萎靡少动等表现,随着时间的延长,逐渐出现脊背弓起、步态不稳、偏侧或转圈,模型 M2、M4 组在接种细胞 10 d 后出现上述症状 (图 1)。M1 组分别于接种 28 d、29 d 各死亡 1 只,M3 组于接种 29 d 死亡 1 只。至观察周期 32 d,M1、M3 组生存率分别为 33%、67%,M2、M4 组全部生存 (图 2)。



注:A:接种 28 d 模型组小鼠瘦弱、萎靡;B:濒死前小鼠状态。

图 1 SCID beige 小鼠经尾静脉接种细胞后生存状态

Note. A: Emaciated and flagging appearance of model groups at day 28. B: Agonal living state of the mouse.

Figure 1 Living state of SCID beige mice after inoculation

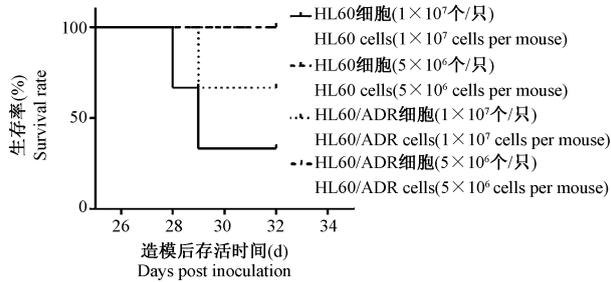


图2 造模各组小鼠生存曲线

Figure 2 Survival curves of the four model groups

四组模型鼠、对照组鼠经 X 线照射后 7 d 内体重均下降,各模型组体重随着时间的推移逐渐下

降,接种第 28 天较第 0 天体重明显降低, M1、M3 两组下降更为显著,均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 血常规检测及外周血细胞形态变化

各组小鼠经 X 线照射 7 d 内白细胞迅速降低,随时间推移,逐渐上升,第 28 天各模型组白细胞计数均显著高于对照组,各模型组间差异无显著性,见表 2;经 X 线照射 SCID beige 小鼠的血红蛋白含量下降,对照组第 18 天时恢复至一般水平,第 28 天 M1、M3 模型组血红蛋白含量均明显低于对照组,且 M3 组下降最为显著,见表 3;照射后各组小鼠血小板计数一过性迅速减少,随时间推移,均逐渐回升, M2 组小鼠血小板回升最明显,较其他组别明显增多,见表 4。

表 1 SCID beige 小鼠各组体重变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3, g$ )

Table 1 Changes in body weights of SCID beige mice in the five groups

时间 (d) Days	体重 Body weight					P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	对照组 Control group	
0	16.21 ± 0.41	15.78 ± 0.29	15.88 ± 0.52	16.27 ± 0.89	15.70 ± 0.36	0.682
7	14.44 ± 0.24**	15.21 ± 0.37	14.18 ± 0.28*	15.85 ± 0.84	14.31 ± 0.26**	0.009
14	15.35 ± 0.10	14.96 ± 0.44	15.50 ± 0.70	15.68 ± 0.55	15.79 ± 0.45	0.168
21	15.48 ± 1.62	15.20 ± 0.55	16.77 ± 0.63	15.81 ± 0.67	16.28 ± 0.29	0.194
28	12.63 ± 0.54*	14.22 ± 0.49**	13.16 ± 0.35*	13.81 ± 0.74*	17.39 ± 0.27**	0.000

注: M1 组: 接种 HL60 细胞  $1 \times 10^7$  个/只; M2 组: 接种 HL60 细胞  $5 \times 10^6$  个/只; M3 组: 接种 HL60/ADR 细胞  $1 \times 10^7$  个/只; M4 组: 接种 HL60/ADR 细胞  $5 \times 10^6$  个/只。下表同。与第 0 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. M1 group: inoculated with  $1 \times 10^7$  HL60 cells per mouse; M2 group: inoculated with  $5 \times 10^6$  HL60 cells per mouse; M3 group: inoculated with  $1 \times 10^7$  HL60/ADR cells per mouse; M4 group: inoculated with  $5 \times 10^6$  HL60/ADR cells per mouse. The same in the following tables. Compared with data obtained before X-ray irradiation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表 2 SCID beige 小鼠各组外周血白细胞数变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3, \times 10^9/L$ )

Table 2 Changes in numbers of while blood cells in peripheral blood of SCID beige mice in the five groups

时间 (d) Days	外周血白细胞数 Number of while blood cells in peripheral blood					P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	对照组 Control group	
0	1.34 ± 0.14	1.39 ± 0.36	1.35 ± 0.25	1.25 ± 0.21	1.67 ± 0.41	0.486
10	0.27 ± 0.16**	0.26 ± 0.90	0.12 ± 0.04*	0.27 ± 0.12*	0.21 ± 0.07*	0.265
18	0.74 ± 0.48	0.75 ± 0.13**	1.00 ± 0.47	1.12 ± 0.42	0.39 ± 0.05*	0.192
28	2.67 ± 0.61	3.10 ± 0.26**	3.07 ± 0.37*	3.32 ± 0.35*	0.60 ± 0.21	0.000

注: 与第 0 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with data obtained before X-ray irradiation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表 3 SCID beige 小鼠各组外周血血红蛋白含量变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3, g/L$ )

Table 3 Changes in hemoglobin levels in peripheral blood of SCID beige mice in the five groups

时间 (d) Days	外周血血红蛋白含量 Hemoglobin levels in peripheral blood					P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	对照组 Control group	
0	175.33 ± 8.33	170.33 ± 13.58	170.33 ± 8.08	173.00 ± 15.13	135.67 ± 30.11	0.090
10	147.67 ± 6.11**	142.33 ± 9.07*	128.67 ± 15.18	135.00 ± 10.58*	119.00 ± 43.49	0.405
18	151.67 ± 5.69*	148.33 ± 9.07	146.33 ± 2.09*	134.33 ± 8.33	142.00 ± 9.00	0.110
28	141.67 ± 2.89*	150.67 ± 4.93	139.33 ± 5.51**	165.00 ± 8.19*	145.33 ± 7.02	0.038

注: 与第 0 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with data obtained before X-ray irradiation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

镜下 HL60、HL60/ADR 细胞多呈圆形或椭圆形,细胞核大而圆,占 3/4 面积以上,细胞质量少为深蓝色(HL60、HL60/ADR 细胞形态见图 3,模型组外周血涂片见图 4)。每只接种  $1 \times 10^7$  个细胞的 M1、M3 组小鼠外周血涂片中第 10 天开始偶见白血病细胞, M2、M4 两组则于接种第 18 天观察到白血病细胞,由于 SCID beige 小鼠的 T、B 淋巴细胞功能缺失,并具备 beige 小鼠典型的自然杀伤细胞

(natural killing cells, NK) 功能缺陷,且经过 X 线 2Gy 预处理后,骨髓造血功能受到明显抑制,外周血涂片中少见有核细胞,白血病细胞比例难以统计,第 21 天时每片可计数 100 个细胞, M1 组白血病细胞比例最高,至第 28 天时造模四组外周血白血病细胞比例均明显增多, M3 组最为显著,见表 5。对照组外周血涂片始终未见白血病细胞。

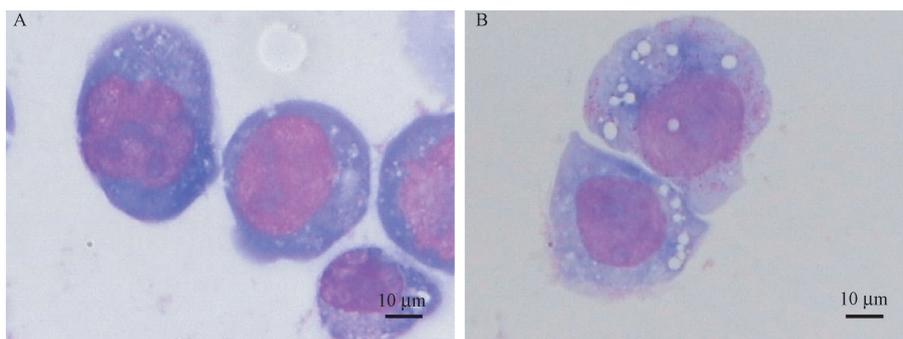
表 4 SCID beige 小鼠各组外周血血小板计数变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3, \times 10^9/L$ )

Table 4 Changes in numbers of platelets in peripheral blood of SCID beige mice in the five groups

时间(d) Days	外周血血小板计数 Number of platelets in peripheral blood					P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	对照组 Control group	
0	701.67 ± 59.67	644.33 ± 73.33	772.95 ± 96.74	660.67 ± 104.71	423.33 ± 228.19	0.556
10	224.00 ± 7.21 **	140.00 ± 22.91 *	220.33 ± 17.14 *	148.33 ± 22.23 *	180.67 ± 118.75	0.127
18	340.33 ± 111.38	409.00 ± 134.08	434.67 ± 49.57	260.67 ± 127.16 *	235.00 ± 54.84	0.138
28	672.00 ± 15.52	903.00 ± 92.19 *	556.67 ± 176.70	527.67 ± 82.55	230.00 ± 140.63	0.000

注:与第 0 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with data obtained before X-ray irradiation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

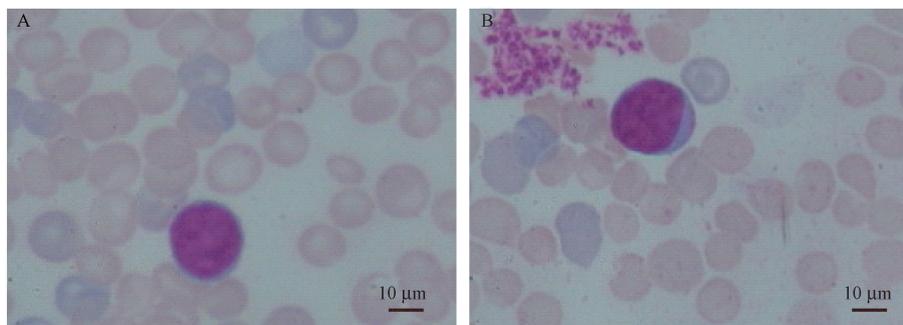


注: A: HL60 细胞形态; B: HL60/ADR 细胞形态。

图 3 细胞形态(吉姆萨-瑞氏染色,  $\times 1000$ )

Note. A: HL60 cell morphology. B: HL60/ADR cell morphology.

Figure 3 Cell morphology. Wright Giemsa staining



注: A: 接种 HL60 小鼠外周血白血病细胞形态; B: 接种 HL60/ADR 小鼠外周血白血病细胞形态。

图 4 模型组小鼠外周血白血病细胞形态(吉姆萨-瑞氏染色,  $\times 1000$ )

Note. A: Leukemic cell morphology in peripheral blood after HL60 cell inoculation. B: Leukemic cell morphology in peripheral blood after HL60/ADR cell inoculation.

Figure 4 Leukemic cell morphology in peripheral blood. Wright Giemsa staining

**表 5** SCID beige 小鼠各模型组外周血涂片白血细胞比例变化( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )  
**Table 5** Changes in proportions of leukemia cells in peripheral blood of SCID beige mice in the five groups

时间(d) Days	白血细胞比例 Proportion of leukemia cells				P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	
21	5.47 ± 0.87	4.33 ± 0.76	3.83 ± 0.95	3.60 ± 0.46	0.075
28	14.34 ± 1.63 *	12.68 ± 0.53 **	15.41 ± 0.89 **	12.64 ± 0.56 **	0.025

注:与第 21 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with data obtained at 21 days after inoculation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

**表 6** SCID beige 小鼠各组外周血 CD33 阳性细胞比例变化( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )  
**Table 6** Changes in the rates of CD33-positive cells in peripheral blood of SCID beige mice in the five groups

时间(d) Days	外周血 CD33 阳性细胞比例 Rate of CD33-positive cells in peripheral blood					P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	对照组 Control group	
0	1.26 ± 1.57	1.24 ± 1.41	0.47 ± 0.36	0.32 ± 0.21	1.55 ± 0.75	0.314
10	9.32 ± 2.48 *	7.40 ± 1.34 *	9.00 ± 2.77 *	8.02 ± 0.77 **	1.89 ± 0.20	0.102
18	19.68 ± 2.33 **	18.19 ± 1.82 **	19.78 ± 1.34 **	17.78 ± 0.95 **	1.40 ± 0.57	0.065
28	42.97 ± 3.04 **	40.18 ± 1.94 *	51.72 ± 11.40 **	42.29 ± 2.40 **	1.58 ± 0.66	0.000

注:与第 0 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with data obtained before X-ray irradiation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

**表 7** SCID beige 小鼠各组外周血 CD13 阳性细胞比例变化( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )  
**Table 7** Changes in the rates of CD13-positive cells in peripheral blood of SCID beige mice in the five groups

时间(d) Days	外周血中 CD13 阳性细胞比例 Rate of CD13-positive cells in peripheral blood					P 值 P-value
	M1 组 M1 group	M2 组 M2 group	M3 组 M3 group	M4 组 M4 group	对照组 Control group	
0	0.33 ± 0.16	0.28 ± 0.32	0.11 ± 0.07	0.13 ± 0.09	0.17 ± 0.12	0.501
10	2.67 ± 2.97	0.21 ± 0.07	3.11 ± 0.37 **	1.81 ± 0.81	0.12 ± 0.09	0.001
18	0.40 ± 0.20	2.88 ± 2.12	5.03 ± 6.03	2.80 ± 0.10 **	0.19 ± 0.12	0.000
28	1.57 ± 1.15	2.38 ± 1.20	1.58 ± 1.71	1.59 ± 1.21	0.15 ± 0.12	0.315

注:与第 0 天比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with data obtained before X-ray irradiation, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 2.3 外周血 CD13、CD33 表达变化

各模型组小鼠的 CD33 表达均逐渐增多,第 28 天时 CD33 阳性细胞比例显著高于对照组,然各模型组间差异无显著性,与其尾静脉接种细胞数量无相关性,见表 6。接种 HL60/ADR 细胞后第 10 天、第 18 天 M3、M4 组 CD13 的表达一度显著增加,而第 28 天各组 CD13 阳性细胞比例差异亦无显著性,见表 6。

### 2.4 小鼠骨髓细胞学形态

于第 32 天或濒死前处死小鼠,收集骨髓细胞并涂片,经瑞氏染色油镜下观察,因随实验进程,小鼠极度消瘦,生存状态极差,处死取材时未能吹出骨髓细胞,未能得到有效制片,考虑可能与小鼠骨髓坏死相关。

### 2.5 小鼠脏器组织病理学观察结果

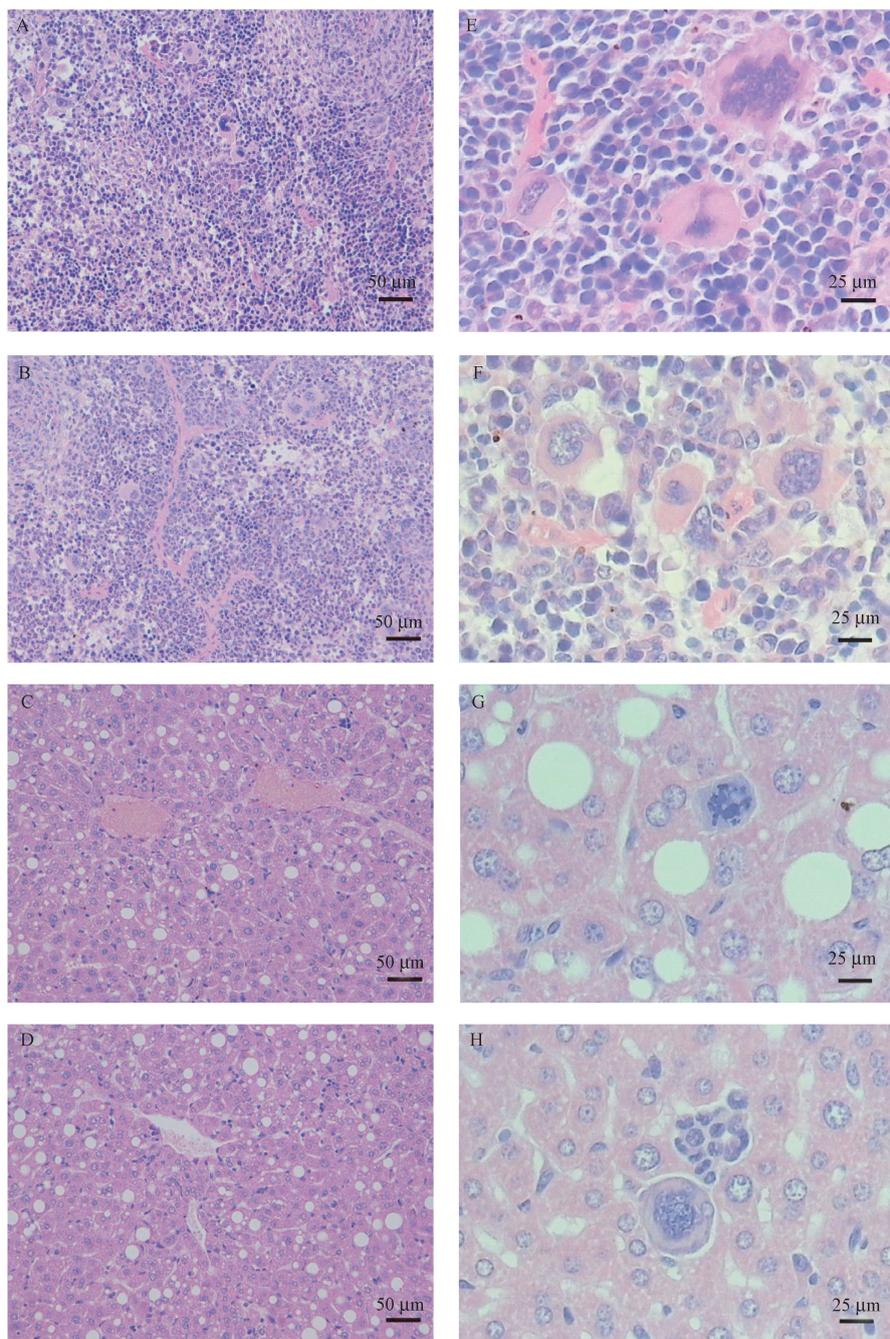
各模型组小鼠脾正常组织结构均完全被破坏,呈现弥漫性异型性多核肿瘤细胞浸润,多核、核仁

清,为白血病细胞浸润灶;肝小叶结构存在,肝细胞大量脂肪变、气球样变、点状坏死,偶见白血病细胞浸润,巨噬细胞可见(图 5);肾组织结构基本正常,未见白血病细胞浸润。

## 3 讨论

SCID beige 小鼠经 X 线预处理后,每只尾静脉注射  $1 \times 10^7$  个或  $5 \times 10^6$  个 HL60、HL60/ADR 细胞均可构建急性髓系白血病动物模型,符合急性髓系白血病的生物学特点,高浓度成瘤更快,但生存期短,中位生存期约 29 d。

前期实验中曾应用 HL60 细胞及 BALB/c-nu/nu 裸鼠构建模型,其中半数经 2GyX 线照射预处理,另半数未作处理,每只均经尾静脉注射  $1 \times 10^7$  个对数生长期 HL60 细胞,经鉴定均未成瘤,接种小鼠均生存,外周血涂片及流式检测未检出白血病细胞,



注:A:M1 组脾(× 200);B:M3 组脾(× 200);C:M1 组肝(× 200);D:M3 组肝(× 200);E:M1 组脾(× 400);F:M3 组脾(× 400);G:M1 组肝(× 400);H:M3 组肝(× 400)。

图 5 模型组小鼠组织病理形态(HE 染色)

Note. A: Spleen of the mice in the M1 group (× 200). B: Spleen of the mice in the M3 group (× 200). C: Liver of the mice in the M1 group (× 200). D: Liver of the mice in the M3 group (× 200). E: Spleen of the mice in the M1 group (× 400). F: Spleen of the mice in the M3 group (× 400). G: Liver of the mice in the M1 group (× 400). H: Liver of the mice in the M3 group (× 400).

Figure 5 Pathomorphological tissue features of the four model groups. HE staining

提示存在不同种属间体内免疫机制排异反应激活<sup>[7]</sup>。有研究显示, BALB/c-nu/nu 裸鼠可经脾切除术, 环磷酰胺腹腔注射及全身亚致死量辐射预处理

后, 经尾静脉注射对数生长期的人源细胞系, 可成功构建白血病模型<sup>[8]</sup>。后于实验中应用环磷酰胺 1 mg/10 g 体重腹腔注射 BALB/c-nu/nu 裸鼠 3

d, 又经 X 线照射后进行静脉接种白血病细胞, 实验小鼠于接种细胞第 3 天开始死亡, 至第 5 天全部死亡。

白血病细胞大都是 NK 细胞敏感性的, 在不同种属的裸鼠体内较难形成全身系统的白血病模型, 多数仅能皮下成瘤<sup>[9]</sup>。BALB/c 裸鼠为先天无胸腺鼠, 缺乏 T 细胞免疫功能, 但具有 B 淋巴细胞及 NK 细胞活性, 且呈年龄依赖性<sup>[10]</sup>, 而经强度较高的预处理后, 经实验验证存活率极低。而 SCID beige 小鼠通过分别携带 scid 和 beige 常染色体隐性突变的 C.B-17scid/scid 小鼠和 C57BL/6bg/bg 小鼠杂交得到的同源系培育而来<sup>[11]</sup>。Beige 基因突变小鼠降低体内 NK 细胞活性, 并能有效改善 C.B-17 SCID 小鼠 Leaky 现象所造成使用上的缺陷, 也较 C.B-17 SCID 小鼠成为更理想的细胞移植的接受者<sup>[12]</sup>。

目前建立白血病动物模型的方法主要有尾静脉注射、腹腔注射和皮下注射三种方法<sup>[13-15]</sup>。其中操作相对简单的皮下注射和腹腔注射, 可使局部(皮下或腹腔)形成瘤块, 且接种成功率高, 但通过上述两种方式建立的模型与临床白血病患者的实际病情发展存在较大差距。故本研究为模拟临床白血病患者的实际病情发展特点, 采用尾静脉注射细胞的方式建立模型, 使白血病细胞可随血液循环形成全身性扩散及局部靶器官的浸润, 能更好地模拟白血病累及骨髓和弥漫生长特点, 以构建符合临床白血病病情特点的模型<sup>[16]</sup>。

本次研究利用 2GyX 线照射预处理, 直接造成免疫系统损伤效应<sup>[17]</sup>, 以破坏小鼠体内残存的免疫防御系统。现已知鼠源性肿瘤细胞的荷瘤鼠模型已较为成熟<sup>[18]</sup>, 但毕竟鼠与人类之间存在种族差异, 选用的 SCID beige 小鼠为建立人源性白血病模型提供了可能, 根据既往的研究成果<sup>[19]</sup>, 本研究中, 经尾静脉分别接种了  $1 \times 10^7$  个/只、 $5 \times 10^6$  个/只两种不同浓度的 HL60、HL60/ADR 细胞株, 通过接种前及接种后 10 d、20 d、28 d 对动物模型的形态学、分子免疫学和组织病理学检测, 发现  $1 \times 10^7$  个/只发病较  $5 \times 10^6$  个/只更快, 各实验组外周血白血病细胞比例均明显升高, 组织病理学检查表明肝、脾脏器内均有不同程度的白血病细胞浸润。本次实验分别应用  $1 \times 10^7$  个/只、 $5 \times 10^6$  个/只细胞成功构建了人急性白血病小鼠模型, 模型动物发病时间长, 生存期稳定, 与课题组既往造模结果一致<sup>[20]</sup>, 为药物干预实验提供了良好的白血病动物模型, 有

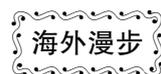
重要的实用价值。

#### 参考文献:

- [1] Wu L, Li Q, Liu Y. Polyphyllin D induces apoptosis in K562/A02 cells through G2/M phase arrest [J]. J Pharm Pharmacol, 2014, 66(5): 713-721.
- [2] Rocha Gda G, Oliveira RR, Kaplan MA, et al. 3 $\beta$ -Acetyltormentic acid reverts MRP1/ABCC1 mediated cancer resistance through modulation of intracellular levels of GSH and inhibition of GST activity [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 741: 140-149.
- [3] Wang H, Wang H, Liang J, et al. Cell-penetrating apoptotic peptide/p53 DNA nanocomplex as adjuvant therapy for drug-resistant breast cancer [J]. Mol Pharm, 2014, 11(10): 3352-3360.
- [4] Sprouse AA, Herbert BS. Resveratrol augments paclitaxel treatment in MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. Anticancer Res, 2014, 34(10): 5363-5374.
- [5] 范磊, 吴雨洁, 张建富, 等. 伴有 t(8;21) 染色体异常急性髓系白血病的免疫表型特征 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(6): 1410-1413.
- [6] 岳保红, 张秋堂, 秦东春, 等. K562 和 HL60 细胞分化抗原的表达 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(3): 467-470.
- [7] Lin JJ, Hsu HY, Yang JS, et al. Molecular evidence of anti-leukemia activity of gypenosides on human myeloid leukemia HL-60 cells *in vitro* and *in vivo* using a HL-60 cells murine xenograft model [J]. Phytomedicine, 2011, 18(12): 1075-1085.
- [8] 王礼学. K562/BALB/c 裸鼠白血病模型的建立及 LDR、IM7 对 CML 患者骨髓干/祖细胞集落形成能力影响的研究 [D]. 徐州医学院, 2008.
- [9] 于文俊, 杨文华, 史哲新, 等. NOD/SCID 小鼠模型在实验血液学研究中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(4): 964-968.
- [10] 时彦胜, 耿志贤, 战大伟, 等. SCID 小鼠和 BALB/c 裸鼠对两株人体肿瘤细胞系移植敏感性的研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(1): 5-10.
- [11] Vasiliki E, Jennifer C, Shruti K, et al. Comparing the MRI appearance of the lymph nodes and spleen in wild-type and immuno-deficient mouse strains [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27508.
- [12] Larbouret C, Gaborit N, Chardes T, et al. In pancreatic carcinoma, dual EGFR/HER2 targeting with cetuximab/trastuzumab is more effective than treatment with trastuzumab/erlotinib or lapatinib alone: implication of receptors down-regulation and dimers disruption [J]. Neoplasia, 2012, 14(2): 121-130.
- [13] Zunino SJ, Storms DH, Newman JW, et al. Resveratrol given intraperitoneally dose not inhibit the growth of high-risk t(4;11) acute lymphoblastic leukemia cells in a NOD/SCID mouse model

- [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4): 1277-1284.
- [14] Greenblatt S, Li L, Slape C, et al. Knock-in of a FLT3/ITD mutation cooperates with a NUP98-HOXD13 fusion to generate acute myeloid leukemia in a mouse model [J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2883-2894.
- [15] 刘伟, 季明春, 李厚达. 人慢性粒细胞白血病动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(1): 55-58.
- [16] 张佳, 杨文华, 杨向东, 等. 尾静脉注射 K562 细胞建立慢性髓系白血病小鼠模型及其鉴定 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(3): 773-776.
- [17] 金字林, 吴洁莹, 陆琰, 等. 6.0GyX 射线辐照所致 BALB/c 小鼠造血系统损伤的动态检测 [J]. *中国医药导报*, 2017, 14(13): 13-16.
- [18] 张晓红, 江和碧, 叶铁真, 等. HL60/VCR 耐药细胞荷瘤鼠模型的建立 [J]. 2013, 44(5): 1-3.
- [19] 文良雪, 刘鑫, 李会, 等. KCL22/NOD-SCID 小鼠慢性粒细胞白血病移植瘤模型的建立及其鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 188-193.
- [20] 田晓琳, 许亚梅, 王珍珍, 等. 尾静脉注射及皮下接种方法建立小鼠高表达 miR-17-92 的 L1210 白血病模型比较研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(8): 3449-3453.

[收稿日期]2017-12-18



## 第 65 届日本实验动物学会年会参会及考察活动

应日本实验动物学会的邀请,由中国实验动物学会组织,多家单位派出的多名研究人员共 16 人组成的出访团,中国医学科学院医学实验动物研究所党委副书记邓巍博士担任团长、郑州大学医药科学研究院章金涛教授和上海实验动物研究中心谢建芸研究员担任副团长、中国医学科学院医学实验动物研究所于品博士担任秘书。代表团于 2018 年 5 月 16 日—19 日出席了在日本富山县召开的“第 65 届日本实验动物学会年会”并访问和考察了日本东京大学医科学研究所实验动物中心。

第 65 届日本实验动物学会年会为期 3 天,本次会议主题为“实验动物科学的多样性与和谐”,学术报告和实验动物相关大型展会是本次会议的主要形式,其中,学术报告围绕实验动物相关技术、实验动物模型的制作和应用、实验动物福利等多方面内容展开;大型会展体现了日本实验动物相关企业的蓬勃发展,展品包括实验动物基础饲养设施、饲养环境监测设备、动物表型分析相关仪器及相关实验耗材等,种类多样,显示出日本实验动物学科学与相关产业的高度协调发展。本人的研究方向为肿瘤与免疫,其主要内容为利用免疫缺陷型小鼠接种人源肿瘤建立人源肿瘤异种移植模型(PDX 模型),几乎一半的工作时间和精力花费在实验动物的饲养、管理和模型制作上。利用本次会议深入了解了日本实验动物学科的发展以及日本东京大学医科学研究所实验动物中心的运行、管理及服务保障运行模式,收获颇多。

通过各位同仁的共同努力圆满完成各项出访交流任务,开拓了视野,增长了见识,拓宽了思路。首先,日本实验动物发展过程中有诸多好的经验值得我们学习,日本实验动物的研究人员在开展动物实验过程中的实验方法及思路也值得我们借鉴,比如,实验设计的严谨、敢于挑战权威实验方法并进行改进等。其次,我们应该加强对实验动物的管理、提高实验动物福利及规范实验动物从业人员的培训等。再次,我们应该进一步加强对外交流和合作,引进国外的先进技术,加强现有实验动物设施建设,加大人才培养与队伍建设,提高工作效率和科研水平,为中国实验动物的发展创造良好的条件,创建国际一流的实验动物医学研究机构。

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心 韦荣飞)